

Institut für Veterinärbakteriologie der Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. M. M. Wittenbrink

Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. R. Hoop

**Nachweis ausgewählter aviärer Infektionserreger in
100 Schweizer Legehennenherden mittels real-time
PCR**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von
Risch Bandli

Tierarzt
von Andeer GR, Schweiz

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Hoop, Referent
Prof. Dr. J.-M. Hatt, Korreferent

Zürich 2009

Abkürzungsverzeichnis

AI	Aviäre Influenza
AIV	Aviäres Influenza Virus
AKB	Aussenklimabereich (Wintergarten)
APV	Aviäres Pneumovirus
AMPV	Aviäres Metapneumovirus
BTS	Besonders tierfreundliche Stallhaltungssysteme
CRD	Chronic Respiratory Disease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FFE	Federfollikelepithel
IB	Infektiöse Bronchitis
IBV	Infektiöses Bronchitis Virus
ILT	Infektiöse Laryngotracheitis
ILTV	Infektiöses Laryngotracheitis Virus
IVI	Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe
MD	Marek disease
MDV	Marek disease Virus
Mg	Mycoplasma gallisepticum
Ms	Mycoplasma synoviae
ND	Newcastle Disease
NDV	Newcastle Disease Virus
NRGK	Nationales Referenzzentrum für Geflügel- und Kaninchenkrankheiten, Vetsuisse Zürich
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMV	Paramyxovirus
PsHV-1	Psittacid Herpesvirus 1 (Pacheco's Disease Virus)
RAUS	Regelmässiger Auslauf ins Freie
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
TRT	Rhinotracheitis der Trute

Inhaltsverzeichnis

Institut für Veterinärbakteriologie der Universität Zürich	1
Inaugural-Dissertation	1
<u>1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</u>	<u>5</u>
<u>2. INFektionsKRANKHEITEN.....</u>	<u>6</u>
2.1 RNS - VIREN	6
2.1.1 AVIÄRES INFLUENZAVIRUS (KLASSISCHE GEFLÜGELPEST).....	6
2.1.2 NEWCASTLE DISEASE VIRUS (NEWCASTLE KRANKHEIT, ATYPISCHE GEFLÜGELPEST)	6
2.1.3 AVIÄRES METAPNEUMOVIRUS (TURKEY RHINOTRACHEITIS, SWOLLEN HEAD-SYNDROM)	7
2.1.4 INFEKTIÖSES BRONCHITIS VIRUS (INFEKTIÖSE BRONCHITIS).....	7
2.2 DNS-VIREN	8
2.2.1 GALLINES HERPESVIRUS 1 (INFEKTIÖSE LARYNGOTRACHEITIS)	8
2.2.2 MAREK DISEASE VIRUS (MAREKSCHKE KRANKHEIT)	9
2.3 BAKTERIEN.....	9
2.3.1 MYCOPLASMA GALLISEPTICUM (MYKOPLASMOSE)	9
<u>3. MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>11</u>
3.1 MATERIAL	11
3.1.1. PROBENMATERIAL	11
3.1.2. POSITIV- UND NEGATIVKONTROLLEN FÜR DIE REAL-TIME PCR	11
3.1.3. BETRIEBE.....	12
3.2 METHODEN.....	13
3.2.1 PROBENENTNAHME UND AUFBEREITUNG.....	13
3.2.2 NUKLEINSÄURE-EXTRAKTION	13
3.2.2.1 RNS-Isolation aus Gewebe	13
3.2.2.2 DNS-Isolation aus Gewebe.....	14
3.2.2.3 DNS-Isolation aus Federn.....	14
3.2.3 REAL-TIME PCR METHODEN.....	14
3.2.3.1 Real-time Reverse-Transcription (RT)-PCR zum Nachweis von RNS-Viren	14
3.2.3.2 Real-time PCR zum Nachweis von DNS-Viren und Bakterien	17
<u>4. RESULTATE</u>	<u>19</u>
<u>5. DISKUSSION</u>	<u>21</u>
5.1 AVIÄRES INFLUENZAVIRUS (KLASSISCHE GEFLÜGELPEST)	21
5.2 NEWCASTLE DISEASE VIRUS (NEWCASTLE KRANKHEIT, ATYPISCHE GEFLÜGELPEST).....	22
5.3 AVIÄRES METAPNEUMOVIRUS (TURKEY RHINOTRACHEITIS, SWOLLEN HEAD-SYNDROM)	22
5.4 INFEKTIÖSES BRONCHITIS VIRUS (INFEKTIÖSE BRONCHITIS).....	23
5.5 GALLINES HERPESVIRUS 1 (INFEKTIÖSE LARYNGOTRACHEITIS)	24
5.6 MAREK DISEASE VIRUS (MAREKSCHKE KRANKHEIT)	24
5.7 MYCOPLASMA GALLISEPTICUM (MYKOPLASMOSE).....	25
5.8 STAUB - UND FEDERPROBEN	25

7. LITERATURVERZEICHNIS.....	29
-------------------------------------	-----------

1. Einleitung und Zielsetzung

1981 wurde die Käfighaltung für Legehennen in der Schweiz verboten. Seit Ablauf der zehnjährigen Übergangsfrist (1992) werden in der Schweiz alle Legehennen in verschiedenen Systemen der Bodenhaltung gehalten. Ab 2003 kam es zur massiven Förderung alternativer Haltungssysteme mit Auslauf. Heute stammen knapp 70% der Eier aus Betrieben mit Freilandhaltung. Bei dieser Art der Haltung ist der Kontakt der Hühner mit der Aussenwelt viel intensiver als bei der herkömmlichen Käfighaltung. Durch Wildvögel, Insekten, Wildnager und andere Tiere, aber auch durch die Umgebungsluft kann es zur Übertragung von Krankheitserregern auf die Hühner kommen.

Die Tiergesundheit beim Nutzgeflügel kann in der Schweiz trotz der Zunahme alternativer Haltungssysteme in den letzten Jahren als sehr gut bezeichnet werden. Dies stützt sich vor allem auf Massnahmen wie die Biosekurität, den restriktiven Einsatz von Lebendvakzinen und Impfverbote für Tierseuchen. Begünstigend kommt auch die geringe Verbreitung der einzelnen Infektionserreger hinzu.

In der vorliegenden Arbeit wurden 100 Legehennenherden kurz vor dem Ausstallen mittels real-time PCR auf ausgewählte aviäre Krankheitserreger untersucht, welche wirtschaftlich von grosser Bedeutung sind.

Neben herkömmlichem Probenmaterial (Kloaken- und Choanentupfer sowie Blutproben) wurden Staub- und Federproben genommen, um herauszufinden, ob diese einfach zu gewinnenden Proben als Indikatoren für den Gesundheitsstatus von Legehennenherden geeignet sind. Probenmaterial dieser Art könnte in Zukunft eingesetzt werden, um schnell und ohne grossen Aufwand einen Überblick über den Gesundheitsstatus einer Legehennenherde zu gewinnen.

2. Infektionskrankheiten

Die Erkrankungen des Geflügels werden in virale und bakterielle Erkrankungen, Mykosen, Parasitosen und nicht infektiöse Erkrankungen unterteilt.

Die in dieser Arbeit untersuchten, in Europa regelmässig vorkommenden Infektionserreger werden kurz vorgestellt. Viren stellen den grössten Anteil der wirtschaftlich relevanten Krankheitserreger des Nutzgeflügels dar.

2.1 RNS - Viren

2.1.1 Aviäres Influenzavirus (Klassische Geflügelpest)

Bei der aviären Influenza handelt es sich um eine hochkontagiöse Erkrankung der Hühnervögel, die durch Orthomyxoviren des Subtyps A hervorgerufen wird und zu grossen Verlusten in der Geflügelindustrie führen kann. Es existieren zahlreiche Subtypen, die sich in den 2 Oberflächenproteinen Hämagglutinin (H, 16 Subtypen) und Neuraminidase (N, 9 Subtypen) unterscheiden. Die aviären Influenzaviren werden aufgrund ihrer Pathogenität bei Hühnern in "Highly Pathogenic Avian Influenza" (HPAI) und in "Low Pathogenic Avian Influenza" (LPAI) eingeteilt (Alexander et al., 2000).

Eine Infektion mit aviären Influenzaviren kann beim Huhn zu Schnupfen, Sinusitis und Ödemen am Kopf führen. Oft treten auch Durchfall und ZNS-Störungen auf. Der Rückgang der Legeleistung kann bis zu 100% betragen. Die Infektion zeigt je nach Pathogenität des Virusstammes eine hohe Morbidität und Mortalität. Wildvögel, vor allem Wasservögel, in welchen Aviäre Influenza-Viren in einer schwach virulenten Form vorkommen, bilden das Erregerreservoir. Bei der Infektion grosser Geflügelherden kann durch Änderungen in der Aminosäuresequenz des Hämagglutinins aus einem schwach virulenten Virus (LPAI) ein hochvirulenter Virusstamm (HPAI) entstehen (Werner, 2006).

2.1.2 Newcastle disease Virus (Newcastle Krankheit, Atypische Geflügelpest)

Die Newcastle Krankheit wird durch aviäre Paramyxoviren des Serotyps 1 hervorgerufen und ist nahezu weltweit verbreitet. Sie ist eine hochkontagiöse Erkrankung und führt zu wechselnden Krankheitsbildern und Verlusten überwiegend bei Hühnervögeln (Pham et al., 2005). Die aviären Paramyxoviren können in 9 Serotypen (PMV1-PMV9) eingeteilt werden. Wie bei

anderen RNS-Viren haben die aviären Paramyxoviren eine hohe Mutationsrate, was über die Jahrzehnte zur Bildung verschiedener Subpopulationen und zur Veränderung der Virulenz geführt hat. Die wichtigsten Glykoproteine der Hülle sind das Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (HN) und das Fusions-Protein (F), welche für die Infektiösität des Virus verantwortlich sind (Wise et al., 2004). Die Klinik hängt vom Pathotyp ab. In der Schweiz ist in der Regel mit einer hohen Morbidität und einer hohen Mortalität zu rechnen. Die Hühner zeigen Rasselgeräusche der Atmung, Zyanose und Kopfödeme. Es kommt zu einer hochgradigen Legeleistungsdepression (30-100%) mit dünnschaligen Eiern. Das Virus ist für alle Vogelarten infektiös, jedoch ist die Empfänglichkeit sehr unterschiedlich. Enten und Gänse zeigen bei einer Infektion praktisch keine Krankheitssymptome. Die Übertragung erfolgt vor allem horizontal und aerogen, eine vertikale Übertragung ist möglich, jedoch nicht von Bedeutung, da der Embryo in der Regel bereits vor dem Schlupf abstirbt.

2.1.3 Aviäres Metapneumovirus (Turkey rhinotracheitis, Swollen Head-Syndrom)

Seit den frühen Achtzigerjahren werden aviäre Metapneumoviren als Ursache für Erkrankungen des Respirations- und Reproduktionstraktes bei verschiedenen Hühnerartigen (Truten, Hühnern und Fasanen) diagnostiziert (Gough et al., 2003).

Unter den aviären Pneumovirusinfektionen ist die Rhinotracheitis der Trute (TRT) die bekannteste Form. Sie ist eine hochkontagiöse Infektion der oberen Atemwege der Truten. Beim Huhn tritt sie mit einer charakteristischen Bildung von subkutanen Oedemen im Kopfbereich auf (Swollen Head-Syndrom). 4 Untergruppen (A-D) sind bekannt (Bayon-Auboyer et al., 2000). In Europa treten die Untergruppen A, B und D auf, wobei in den letzten Jahren Untergruppe B am häufigsten diagnostiziert wurde. Vertreter der Untergruppe C wurden erstmals 1996 in Truten mit Symptomen einer Rhinotracheitis in den USA identifiziert (Guionie et al., 2006) und sind bis heute in Europa nicht aufgetreten.

Eine Infektion mit aviären Pneumoviren führt u.a. zu Rhinitis, Sinusitis und Konjunktivitis. Morbidität und Mortalität können stark variieren. Legeleistungseinbrüche bis zu 50% sind möglich.

2.1.4 Infektiöses Bronchitis Virus (Infektiöse Bronchitis)

Die Infektiöse Bronchitis ist eine hochansteckende Erkrankung des oberen Respirationstraktes von Hühnern und Fasanen (Cavanagh et al., 2007). Sie hat aufgrund ihrer hohen Morbidität und der damit verbundenen grossen Verluste in der Eiproduktion eine grosse Bedeutung für die

Geflügelindustrie (Callison et al., 2006a). Weltweit wird das Nutzgeflügel gegen IB geimpft. Obwohl das IB-Virus vor allem respiratorische Erkrankungen auslöst, kann es sich auch in verschiedenen Oberflächenepithelien nicht-respiratorischer Organe (z.B. Niere oder Eileiter) vermehren. Das IB-Virus ist ein Einzelstrang-RNS-Virus aus der Familie der Coronaviridae. Es sind 9-11 verschiedene Serotypen bekannt, die sich in Pathogenität, Immunogenität und Organaffinität unterscheiden (Callison et al., 2006a). Bei einigen dieser Serotypen (Variantstämme wie z.B. D-274, D-1466, 793B0, 755), die erst in den letzten Jahren aufgetreten sind, ist der übliche Impfschutz nicht ausreichend.

Infizierte Küken zeigen Atemnot, Niesen und Röcheln. Die Morbidität liegt bei 100%, und auch die Mortalität kann bei Küken bis zu 80% betragen. Küken, die eine Infektion überstanden haben, können zu falschen Legerinnen werden. Bei diesen Tieren gelangen die Follikel aufgrund von Verklebungen im Bereich des Infundibulums nicht in den Eileiter.

Legehennen zeigen mehr oder weniger ausgeprägte respiratorische Symptome. Auffallend sind jedoch eine reduzierte Legeleistung (10-30%) während 6-8 Wochen, Eier mit deformierten Schalen und wässrigem Eiklar sowie ein Rückgang von Brut- und Schlupfergebnissen.

2.2 DNS-Viren

2.2.1 Gallines Herpesvirus 1 (Infektiöse Laryngotracheitis)

Die Infektiöse Laryngotracheitis ist eine Erkrankung des oberen Respirationstraktes mit einer weltweiten Verbreitung (Sellers et al., 2003). Das ILT-Virus zählt zur Gruppe der alpha-Herpesvirinae, aus der Familie der Herpesviridae und wird auch als „Gallines Herpesvirus 1“ bezeichnet.

Für ILT charakteristische Symptome sind Keuchen, Husten, Niesen, Nasenausfluss und Konjunktivitis. Die akute Form ist gekennzeichnet durch Dyspnoe, blutig-schleimigen Auswurf, Kopfschütteln und Rückgang der Legeleistung. Diese Erkrankung tritt vor allem in Gebieten mit intensiver Geflügelwirtschaft auf und geht einher mit einer hohen Morbidität und einer geringen Mortalität. Ausbrüche führen vor allem aufgrund der verminderten Legeleistung zu massiven Verlusten in der Geflügelindustrie (Callison et al., 2006b).

In der Schweiz ist die Infektiöse Laryngotracheitis vor allem in Rassegeflügelbeständen verbreitet und wird bei Ausstellungen und Zukäufen von Tier zu Tier übertragen (Hoop, 2002).

2.2.2 Marek disease Virus (Mareksche Krankheit)

Die Mareksche Krankheit ist eine häufig vorkommende, lymphoproliferative Erkrankung der Hühnervögel. Sie ist charakterisiert durch Rundzellinfiltrate in peripheren Nerven und Organen. Das Virus der Marekschen Krankheit (MDV) ist ein oncogenes Virus, welches sich in lymphoidem und epitheliale Gewebe vermehrt (Calnek et al., 1970). Es zählt zum Genus *Mardivirus* der Subfamilie *Alphaherpesvirinae* aus der Familie der *Herpesviridae*. Es können 3 Serotypen unterschieden werden, wobei der Serotyp 1 alle für Hühner und Truten virulenten Stämme enthält (Islam et al., 2006). Isolate dieses Serotyps können verschiedene Krankheitsformen hervorrufen. Bei der tumorösen (akuten) Form entstehen nach einer zytolytischen ersten Phase lymphoproliferative Herde, die nach ca. einem Monat zu soliden Tumoren heranwachsen. Die Tiere zeigen Entwicklungsstörungen und Anämie. Bei der neuronalen (klassischen) Form sind die peripheren Nerven und das Gehirn betroffen, in welchen es zu entzündlich-degenerativen Veränderungen kommt. Die Tiere zeigen schlaffe Lähmungen in den Flügeln und Beinen. Weniger häufige Verlaufsformen stellen die Augenform, die vorübergehende Lähmung (transiente Paralyse) und eine persistierende neurologische Erkrankung dar.

Die Vermehrung der Viren im Federfollikelepithel (FFE) ist sehr effektiv und resultiert in der Freisetzung von behüllten, zellfreien Viren, die mit Haut und Federepithel abgestossen werden (Calnek et al., 1970). Innerhalb des Federepithels sind die Viren in der Aussenwelt sehr stabil (Davidson et al., 2002). Bei der Verbreitung der Viren spielt die horizontale Virusübertragung via Federstaub eine grosse Rolle, da nur im FFE reife, behüllte Viruspartikel gebildet und als zellfreie infektiöse Viren ausgeschleust werden (Renz et al., 2006, Islam et al., 2006).

2.3 Bakterien

2.3.1 *Mycoplasma gallisepticum* (Mykoplasmose)

Mykoplasmen gehören zur prokaryontischen Klasse der Mollicutes und besiedeln vor allem den Respirationstrakt von Vertebraten, wodurch sie Krankheiten auslösen können. Ihre Fähigkeit, die Mucosa des Wirtes aktiv zu durchdringen, erhöht ihre Pathogenität (Keeler et al., 1996).

Bei den Vögeln ist die Mykoplasmose eine chronisch verlaufende Infektion des oberen Respirationstraktes, der Luftsäcke und der Gelenke, die vor allem bei Hühnern und Truten auftritt. Infektionen mit *Mycoplasma gallisepticum*, welche ausschliesslich den Respirationstrakt betreffen, können in der Geflügelindustrie grosse wirtschaftliche Verluste verursachen (Callison

et al., 2006b). Die bei einer akuten Mykoplasmosen auftretenden Symptome beinhalten Husten, nasalen Ausfluss und Konjunktivitis. Sekundärinfektionen durch andere Krankheitskeime (z.B. Infektiöses Bronchitis Virus, Aviäres Paramyxovirus oder Escherichia coli) können zu einer ernsthaften Komplikation in Form einer massiven Aerosacculitis führen. Neben der horizontalen Übertragung können Mykoplasmen auch vertikal übertragen werden, sodass die Möglichkeit besteht, dass Küken bereits beim Schlupf infiziert sind.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1. Probenmaterial

Von Mai 2007 bis April 2008 wurden insgesamt 100 Legehennenbetriebe in der Schweiz untersucht, wobei verschiedene Proben gesammelt wurden. Pro Herde wurden 40 Kloaken-, 20 Choanentupfer sowie 10 Federn entnommen. Zusätzlich dienten Staubproben aus dem Tierhaltungsbereich sowie aus dem Vorraum als Probenmaterial. Die Entnahme und Aufarbeitung dieser Proben werden im Methodenabschnitt näher beschrieben.

3.1.2. Positiv- und Negativkontrollen für die real-time PCR

Real-time PCR für:	Positiv-Kontrolle	Referenz / Herkunft
Aviäres Influenza Virus	A/duck/Ukraine/63 (H3N8)	NRGK
Newcastle disease Virus	APMV-1/chicken/Switzerland/Safern/95, APMV-1/chicken/Switzerland/Schaff- hausen/96	NRGK
Aviäres Metapneumovirus A	TRT-Virus 6661	Institute for Animal Health, UK
Aviäres Metapneumovirus B	Nobilis® Rhino AMPV subtype B	Veterinaria AG, Zürich, Schweiz
Infektiöses Bronchitis Virus	IB-Virus AAF 87, IB-Virus D274	Veterinary Laboratories Agency, UK
Infektiöses Laryngotracheitis Virus	charakterisierter Feldstamm 2007	NRGK
Marek disease Virus	charakterisierter Feldstamm 2007	NRGK
Mycoplasma gallisepticum	EPC Mg (MgA2-004)	LSI, France

Als Negativkontrolle wurde bei allen Untersuchungen RNase-freies Wasser (QIAGEN, Schweiz) verwendet.

3.1.3. Betriebe

Für diese Studie wurden schweizweit Betriebe ausgewählt, welche einen Tierbestand von mindestens 1000 Tieren aufwiesen. Weil grosse Legehennenbetriebe vor allem im Flachland und in den Voralpen vorkommen, sind diese Regionen stärker vertreten als die Berggebiete. Insgesamt 100 Legehennenherden wurden jeweils 2 Wochen vor dem Schlachttermin beprobt.

Die Betriebe wurden aus 3 Kategorien ausgewählt:

- **Bodenhaltung (Indoor):**

Mindestens 20% der Bodenfläche müssen mit einem geeigneten Einstreumaterial bedeckt sein. In der alternativen Bodenhaltung werden zusätzlich verschiedene Etagen- und Volièrensysteme verwendet. Es handelt sich um Gitter- und Rostflächen sowie Sitz- und Anflugstangen, die den Tieren als Rückzugs- und Ruhezone dienen. Versorgungseinrichtungen für Futter und Wasser sind in der Regel über den Rostflächen angebracht, in grösseren Beständen meist als Kettenfütterungen sowie Nippel- oder Cuptränken. Die Nester sind meist auf beiden Seiten des Stalles platziert, so dass die Eier maschinell über ein Förderband eingesammelt werden können.

- **Aussenklimabereich (BTS)**

Die Bodenhaltung ist durch einen überdachten Aussenklimabereich (AKB, Wintergarten) erweitert, der nach einer Seite nur mit einem Gitter oder Netz versehen ist. Der Boden des Aussenklimabereiches ist befestigt und muss ebenfalls eingestreut werden. Dadurch wird das Stallklima verbessert und die nutzbare Bodenfläche vergrössert.

- **Freilandhaltung (RAUS):**

In der Freilandhaltung wird den Tieren zusätzlich zum AKB täglicher Auslauf zu einer mehrheitlich begrünten Weide gewährleistet. Um den natürlichen Verhaltensweisen des Huhnes gerecht zu werden, sind Schatten- und Schutzspender zur Strukturierung wichtig.

Insgesamt wurden 10 Herden aus der herkömmlichen Bodenhaltung, 42 Herden aus Bodenhaltung mit Aussenklimabereich und 48 Herden aus Freilandhaltung untersucht.

3.2 Methoden

3.2.1 Probenentnahme und Aufbereitung

Die 40 Kloakentupfer wurden mit sterilen Probegefässen (Swube mm single, BD, Schweiz) gewonnen. Für die Extraktion wurden je 5 dieser Tupfer in ein Zentrifugenröhrchen (Semadeni AG, Ostermundigen, Schweiz) mit 5 ml PBS (Sigma-Aldrich, Schweiz) verbracht. Die 20 Choanentupfer wurden mit sterilen Wattestäbchen gewonnen. Je 5 dieser Tupfer wurden in ein Zentrifugenröhrchen (Semadeni AG, Ostermundigen, Schweiz) mit 10 ml PBS (Sigma-Aldrich, Schweiz) verbracht. Diese Fünferpools wurden anschliessend für die Extraktion verwendet. Bei den 10 gewonnenen Federn handelte es sich um Halbdunenfedern aus dem Unterflügelbereich. Ihnen wurden für die Extraktion die verdickten Enden der Spule (Umbilicus proximalis) abgeschnitten und als Zehnerpools weiterverarbeitet. Die 2 Staubproben (ca. 5g) wurden mit einem Handstaubsauger in sterilen Baumwollsäckchen gewonnen. Eine Staubprobe stammte direkt aus dem Hühnernest, die andere aus einem Vorraum. Sie wurden je in ein Zentrifugenröhrchen (Semadeni AG, Ostermundigen, Schweiz) mit 10 ml PBS (Sigma-Aldrich, Schweiz) verbracht. Der im PBS gelöste Staub wurde anschliessend für die Extraktion verwendet.

3.2.2 Nukleinsäure-Extraktion

3.2.2.1 RNS-Isolation aus Gewebe

Die Extraktion erfolgte mit dem Nucleic Acid Isolation System, Quick Gene-810 (Fujifilm Life science, Dielsdorf, Schweiz) unter Verwendung des Extraktionskits QuickGene RNA tissue kit S (Fujifilm Life science, Dielsdorf, Schweiz). Die Methode wurde gemäss den Protokollen des Herstellers durchgeführt. 400 µl der vorbereiteten Probe wurden mit 200 µl Lysis Buffer LRT (Fujifilm Life science, Dielsdorf, Schweiz) versetzt und gemischt. Die Probe wurde anschliessend für 5 Minuten bei 94°C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Nach dem Abkühlen wurden 210 µl Ethanol (96%) dazu gegeben, und 750 µl des Gemisches auf die Extraktionssäule (QuickGene RNA tissue kit S, Fujifilm Life science, Dielsdorf, Schweiz) pipettiert. Die extrahierte RNS wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

3.2.2.2 DNS-Isolation aus Gewebe

Um die DNS aus dem Gewebe zu extrahieren wurden der QuickGene DNA tissue kit S (Fujifilm Life science, Dielsdorf, Schweiz) und das Nucleic Acid Isolation System, Quick Gene-810 (Fujifilm Life science, Dielsdorf, Schweiz) verwendet. Die Methode wurde gemäss den Protokollen des Herstellers durchgeführt. 400 µl der vorbereiteten Probe wurden mit 180 µl Lysis Buffer LDT (Fujifilm Life science, Dielsdorf, Schweiz) und 20 µl Proteinase K (Fujifilm Life science, Dielsdorf, Schweiz) versetzt und gemischt. Die Probe wurde für 10 Minuten bei 70°C erhitzt und sofort auf Eis gekühlt. Anschliessend erfolgte die Zugabe von 240 µl Ethanol (96%), und 750 µl des Gemisches wurden auf die Extraktionssäule (QuickGene DNA tissue kit S, Fujifilm Life science, Dielsdorf, Schweiz) pipettiert. Die extrahierte DNS wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

3.2.2.3 DNS-Isolation aus Federn

Zuerst wurden die Spitzen des Kiels (ca. 0.5 cm) abgeschnitten und in ein Keramik-Kugelhörnchen (LabForce, Schweiz) verbracht. Anschliessend wurden 200 µl MDT (Fujifilm Life science, Dielsdorf, Schweiz) und 20 µl Proteinase K (Fujifilm Life science, Dielsdorf, Schweiz) dazupipettiert. Die Hörnchen wurden in einem Homogenisator (Precellys 24, Bertin technologies, France) verarbeitet und anschliessend zentrifugiert (1-1½ min bei 8000 rpm). Der Überstand (ca. 180 µl) wurde in ein steriles Eppendorfhörnchen pipettiert, mit 180 µl LDT (Fujifilm Life science, Dielsdorf, Schweiz) versetzt und gemischt. Anschliessend wurde das Hörnchen 20 Minuten bei 70°C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Nach dem Abkühlen wurden 240 µl Ethanol (96%) dazupipettiert und gemischt. 800 µl des Gemisches wurden auf die Extraktionssäule (QuickGene DNA tissue kit S, Fujifilm Life science, Dielsdorf, Schweiz) pipettiert. Die extrahierte DNS wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

3.2.3 Real-time PCR Methoden

3.2.3.1 Real-time Reverse-Transcription (RT)-PCR zum Nachweis von RNS-Viren

Der Nachweis der viralen Nukleinsäure erfolgte durch eine one-step RT-PCR in einem 7500 Fast Real-Time PCR System von Applied Biosystems (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA 94404 USA). Zur Amplifikation wurden die in untenstehender Tabelle aufgelisteten spezifischen

Primer und Sonden verwendet, welche von der Firma Microsynth AG Balgach, Schweiz synthetisiert wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der SDS Software Version (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA 94404 USA).

TaqMan Primer und Sonden

Aviäre Influenza (Dalessi et al., 2006)	
FluPanA For	5'-AGA TGA GYC TTC TAA CCG A-3'
FluPanA Rev	5'-GCA AGA ACA TCT TCA AGT YTC-3'
FluPanA Sonde	5'-Carboxyfluorescein (FAM)-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA- 5-Carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)-3'
Newcastle Krankheit (Wise et al., 2004)	
NewDis For	5'-AGT GAT GTG CTC GGA CCT TC-3'
NewDis Rev	5'-CCT GAG GAG AGG CAT TTG CTA-3'
NewDisM_Sonde_	5'-YakimaYello (YY)-TTC TCT AGC AGT GGG ACA GCC TGC- (BHQ-1)-3'
Aviäre Metapneumoviren (Guionie et al., 2007)	
AMPV_A_For	5'-GGA CAT CGG GAG GAG GTA CA-3'
AMPV_A_Rev	5'-CAC TCC TCT AAC ACT GAC TGT TCA ACT-3'
AMPV Probe_A	5'-FAM-TGC ACA GTC ACT ATT GCA CTC ACT GTT AGC G- TAMRA-3'
AMPV_B_For	5'-AAT AGT CCT CAA GCA AGT CCT CAG A-3'
AMPV_B_Rev	5'-CTG TCG TAA TTT GAC CTG TTC TAC ACT-3'
AMPV_Sonde B	5'-YakumaYello (YY) -CTG GTG TTA TCA GCC TTA GGC TTG ACG CT-TAMRA-3'
Infektiöse Bronchitis (Callison et al., 2006a)	
IBV5' GU391 For	5'-GCT TTT GAG CCT AGC GTT-3'
IBV5' GU391 Rev	5'-GCC ATG TTG TCA CTG TCT ATT G-3'
IBV5' G Sonde	5'-FAM-CAC CAC CAG AAC CTG TCA CCT C-BHQ1-3'

Reaktions-Ansätze

	AIV	NDV	APV	IBV
H ₂ O (RNase-frei)	7.25 µl	9.2 µl	5.25 µl	3.50 µl
2× QuantiTect Probe RT-PCR Mastermix (QIAgen, Switzerland)	12.50 µl	15 µl	12.50 µl	12.50 µl
Forward Primer (Endkonzentration)	400 nM	300 nM	300 nM	500 nM
Reverse Primer (Endkonzentration)	400 nM	300 nM	300 nM	500 nM
Sonde (Endkonzentration)	100 nM	250 nM	100 nM	100 nM
QuantiTect RT Mix (QIAgen, Switzerland)	0.25 µl	0.75 µl	0.25 µl	0.25 µl
Total RT Master-Mix pro Delle	23.00 µl	27.00 µl	20.00 µl	20.00 µl
Extrakt pro Delle	2.00 µl	3.00 µl	5.00 µl	5.00 µl

Reaktionsbedingungen

	AIV	NDV	APV	IBV
Reverse Transkription	48°C → 30 min			50°C → 30 min
Aktivierung der Polymerase	95°C → 10 min			95°C → 15 min
Synthesezyklen	95°C → 15 sek. 53°C → 1 min	95°C → 15 sek. 60°C → 1 min		94°C → 1 sek. 60°C → 1 min
Anzahl Zyklen	50×	55×	45×	40×
Terminale Verlängerung	70°C → 1 min			

Threshold und Baseline

Virus	Threshold	Baseline
AIV	8.5×10^{-4}	3 (Start)-15 (Ende)
NDV	4.5×10^{-4}	3 (Start)-15 (Ende)
APV A	9.0×10^{-4}	Auto
APV B	9.4×10^{-4}	3 (Start)-15 (Ende)
IBV	8.2×10^{-4}	3 (Start)-15 (Ende)

3.2.3.2 Real-time PCR zum Nachweis von DNS-Viren und Bakterien

Der Nachweis der viralen oder bakteriellen Nukleinsäure erfolgte durch eine PCR in einem 7500 Fast Real-Time PCR System von Applied Biosystems (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA 94404 USA). Zur Amplifikation wurden die in untenstehender Tabelle aufgelisteten spezifischen Primer und Sonden verwendet, welche von der Firma Microsynth AG Balgach, Schweiz synthetisiert wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der SDS Software Version (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA 94404 USA).

TaqMan Primer und Sonden

Infektiöse Laryngotracheitis (Callison et al. 2007)	
ILTV gCU771 For	5'-CCT TGC GTT TGA ATT TTT CTG T-3'
ILTV gCL873 Rev	5'-TTC GTG GGT TAG AGG TCT GT-3'
ILTV Sonde 817	5'-FAM-CAG CTC GGT GAC CCC ATT CTA-BHQ1-3'
Mareksche Krankheit (Islam et al. 2005)	
MD Meq For	5'-GGT CTG GTG GTT TCC AGG TGA-3'
MD Meq Rev	5'-GCA TAG ACG ATG TGC TGC TGA-3'
MD Meq Sonde	5'-FAM-AGA CCC TGA TGA TCC GCA TTG CGA CT-TAMRA-3'
Mycoplasma gallisepticum (Callison et al. 2006b)	
Mglp U26 For	5'-CTA GAG GGT TGG ACA GTT ATG-3'
Mglp 164 Rev	5'-GCT GCA CTA AAT GAT ACG TCA AA-3'
Mglp Sonde	5'-FAM-CAG TCA TTA ACA ACT TAC CAC CAG AAT CTG-BHQ1-3'

Reaktions-Ansätze

	ILTV	MDV	Mg
H ₂ O (Rnase-frei)	2.00 µl	3.5 µl	2.75 µl
2× QuantiTect Probe PCR Mastermix (QIAgen, Switzerland)	12.50 µl	12.50 µl	12.50 µl
Forward Primer (Endkonzentration)	400 nM	400 nM	500 nM
Reverse Primer (Endkonzentration)	400 nM	400 nM	500 nM
Sonde (Endkonzentration)	80 nM	200 nM	100 nM
Total Mastermix pro Delle	20.00 µl	21.00 µl	20.00 µl
Extrakt pro Delle	5.00 µl	4.00 µl	5.00 µl

Reaktionsbedingungen

	ILTV	MDV	Mg
Aktivierung der Uracyl-N-glycosylase	50°C→ 2 min		
Aktivierung der Polymerase	95°C→ 15 min	95°C→ 10 min	
Syntheszyklen	95°C→ 15 sek. 60°C→ 1 min	94°C→ 15 sek. 60°C→ 1 min	
Anzahl Zyklen	40×		

Threshold und Baseline

Erreger	Threshold	Baseline
ILT-Virus	6.5×10^{-4}	Auto
MD-Virus	8.3×10^{-4}	Auto
Mg	7.3×10^{-4}	Auto

4. Resultate

In allen 100 untersuchten Legehennenherden konnten weder AIV- noch NDV-spezifische Gensequenzen nachgewiesen werden.

RNS aviärer Pneumoviren des Serotyp A wurde in 10% der untersuchten Herden detektiert, am häufigsten in Choanentupfern aus der Freilandhaltung (4.7%). 1% (1/100) der Staubproben aus dem Legenest war APV A positiv, während alle Staubproben aus dem Vorraum negativ waren. RNS aviärer Pneumoviren Serotyp B konnten in keiner Herde nachgewiesen werden.

Nur in 2 Herden konnte keine IBV-spezifische RNS gefunden werden. 77% Staubproben aus dem Nest und 91% Staubproben aus dem Vorraum waren IBV positiv.

Bei den aviären Herpesviren konnte DNS des ILTV nur in 2% der Herden, DNS des MDV aber in 72% der Herden nachgewiesen werden. Die ILTV-spezifischen positiven Proben stammten von 2 Federproben. Am meisten MD-spezifische DNS konnte in den Staub- (44.5%), sowie Federproben (37%) von Herden aller untersuchten Haltungssysteme gefunden werden. Für die DNS von MDV waren in 41 % der Staubproben aus dem Nest und 48% aus dem Vorraum nachzuweisen.

Mycoplasma gallisepticum DNS war in 3% der Herden nachweisbar, am häufigsten in den Choanentupfern von Tieren aus der Freilandhaltung (2.6%). Zudem wurden 1% (1/100) der Staubproben aus dem Nest und 2% (2/100) der Staubproben aus dem Vorraum positiv auf Mg spezifische DNS getestet.

Tab. 1 Anteil (%) der PCR-positiven Herden

Haltungssystem	Erreger				
	APV A	IBV	ILT	MD	Mg
Freilauf	12.5% (6/48)	95.8% (46/48)	2.1% (1/48)	68.8% (33/48)	4.2% (2/48)
AKB	9.5% (4/42)	100% (42/42)	2.4% (1/42)	76.2% (32/42)	2.4% (1/42)
Bodenhaltung	0% (0/10)	100% (10/10)	0% (0/10)	70% (7/10)	0% (0/10)
Total	10% (10/100)	98% (98/100)	2% (2/100)	72% (72/100)	3% (3/100)

Tab. 2 Anteil (%) der PCR-positiven Proben

Probenmaterial/ Haltungssystem	Erreger							
	AIV	NDV	APV		IBV	ILTV	MDV	Mg
			A	B				
Kloakentupfer								
Freiland	0% (0/383)	0% (0/383)	1.0% (4/383)	0% (0/383)	67.1% (257/383)		11.5% (44/384)	
AKB	0% (0/336)	0% (0/336)	1.2% (4/336)	0% (0/336)	60.4% (203/336)		7.7% (26/336)	
Bodenhaltung	0% (0/80)	0% (0/80)	0% (0/80)	0% (0/80)	75% (56/80)		7.5% (6/80)	
Total	0% (0/799)	0% (0/799)	1.0% (8/799)	0% (0/799)	64.6% (516/799)		9.5% (76/795)	
Choanentupfer								
Freiland	0% (0/192)	0% (0/192)	4.7% (3/192)	0% (0/192)	48.4% (93/192)		7.8% (15/192)	2.6% (5/192)
AKB	0% (0/168)	0% (0/168)	1.2% (2/168)	0% (0/168)	49.4% (83/168)		3.0% (5/168)	1.2% (2/168)
Bodenhaltung	0% (0/40)	0% (0/40)	0% (0/40)	0% (0/40)	47.5% (19/40)		2.5% (1/40)	0% (0/40)
Total	0% (0/400)	0% (0/400)	1.3% (5/400)	0% (0/400)	48.8% (195/400)		5.3% (21/400)	1.8% (7/400)
Staubproben								
Freiland	0% (0/95)	0% (0/95)	1.1% (1/95)	0% (0/95)	86.3% (82/95)	0% (0/96)	44.8% (43/96)	1% (1/96)
AKB	0% (0/84)	0% (0/84)	0% (0/84)	0% (0/84)	78.6% (66/84)	0% (0/84)	45.2% (38/84)	2.4% (2/84)
Bodenhaltung	0% (0/20)	0% (0/20)	0% (0/20)	0% (0/20)	85% (17/20)	0% (0/20)	40% (8/20)	0% (0/20)
Total	0% (0/199)	0% (0/199)	0.5% (1/199)	0% (0/199)	84.6% (165/195)	0% (0/200)	44.5% (89/200)	1.5% (3/200)
Federproben								
Freiland						2.1% (1/48)	39.6% (19/48)	
AKB						2.4% (1/42)	31% (13/42)	
Bodenhaltung						0% (0/10)	50% (5/10)	
Total						2% (2/100)	37% (37/100)	
Total	0% (0/1398)	0% (0/1398)	1.0% (14/1398)	0% (0/1398)	62.8% (876/1394)	0.7% (2/300)	14.9% (223/1495)	1.7% (10/600)

5. Diskussion

Die vorliegende Untersuchung zeigt eine Momentaufnahme der in den 100 untersuchten schweizerischen Legehennenherden nachgewiesenen Erreger. Der Nachweis von Viren und Bakterien wurde mittels real-time PCR vorgenommen. Bei dieser Methode wird der Erreger durch millionenfache Vervielfältigung eines bestimmten Genabschnitts direkt nachgewiesen, jedoch ohne Informationen über seine Infektiosität zu erhalten. Die Methode hat eine sehr hohe Empfindlichkeit und ist bedeutend schneller als die Virusanzüchtung im Brutei (Baumer et al., 2005).

Gegen einige der untersuchten Infektionskrankheiten ist in der Schweiz eine Impfung zugelassen (IB, MD, Mg und APV) für andere gilt ein Impfverbot (AI, ND und ILT). Verbreitet wird in den Schweizer Legehennenbetrieben gegen IB und MD geimpft, selten gegen Mg und praktisch gar nicht gegen APV. Die in dieser Studie verwendeten PCRs erlauben oft nicht den subtypenspezifischen Nachweis der Erreger. Somit war in der Regel eine Unterscheidung zwischen Impf- und Feldstamm des Virus nicht möglich. Durch die parallel durchgeführten serologischen Untersuchungen konnte jedoch mit grosser Wahrscheinlichkeit zwischen einer Impfung und einer Feldinfektion unterschieden werden. Material, Methoden und Resultate der serologischen Untersuchung sind in dieser Arbeit nicht aufgeführt.

5.1 Aviäres Influenzavirus (Klassische Geflügelpest)

Die Resultate dieser Studie zeigen, dass die untersuchten 100 Legehennenherden frei sind von aviären Influenzaviren. Das Haltungssystem scheint in diesem Falle keine Rolle zu spielen, denn auch die Herden mit Freilandhaltung, welche Kontakt mit Wildvögeln hatten, zeigten keine positiven Resultate. Die Schweiz gilt beim Hausgeflügel als frei von der Tierseuche Aviäre Influenza. Dies hat bereits die Arbeit von Dalessi und Hoop (2006) gezeigt. Sie untersuchten sowohl Wildvögel als auch Nutzgeflügel mittels real-time PCR (mehr als 2000 untersuchte Proben).

Dennoch scheinen schwach pathogene AIV in der Schweiz bei Wildvögeln vorzukommen. Sowohl beim aktiven AI Monitoring (Projekt Constanze) wurden Wildvögel auf schwach pathogene AIV positiv (3 von 246; 1.2%) getestet, als auch bei den Vögeln aus der Jagd (6 von

222; 2.7%). In der Reuse in Sempach wurde 2008 zudem um bei einer gesunden Tafelente ein hochpathogenes H5N1-Virus nachgewiesen. Es kam in der Folge nicht zu weiteren Fällen und auch nicht zu einer erhöhten Mortalität (Baumer, 2008).

Entscheidend für die Seuchenfreiheit ist, dass in der Schweiz und in den nördlichen und östlichen Nachbarländern keine Lebendgeflügelmärkte stattfinden und dass Geflügeltransporte und –ausstellungen in betroffenen Gebieten verboten sind. Damit wird eine längere Persistenz des Virus verhindert (Rutz et al., 2006). Durch illegale Importe von Bruteiern oder geimpften Tieren besteht jedoch die Gefahr, dass aviäre Influenzaviren eingeschleppt werden (Gohm et al., 1999b).

5.2 Newcastle disease Virus (Newcastle Krankheit, Atypische Geflügelpest)

In der vorliegenden Arbeit konnte in keiner der Proben NDV spezifische RNS nachgewiesen werden. Mit der verwendeten PCR lassen sich alle aviären Paramyxoviren vom Serotyp 1 (APMV-1), unabhängig von ihrer Virulenz, nachweisen (Wise et al., 2004). Die Schweiz gilt als frei von der Tierseuche Newcastle Krankheit. Die letzten Ausbrüche liegen schon mehr als 10 Jahre zurück (Bart et al., 2003). Auch neuere Untersuchungen in der Schweiz, bei denen zwischen 2003 und 2006 über 3000 Proben von Wildvögeln mit der real-time PCR auf ND-Virus getestet wurden, ergaben negative Resultate (Camenisch et al., 2008). In der Schweiz wurde dieser Status der Seuchenfreiheit in den letzten Jahren durch ein Impfverbot, rigorose Importkontrollen von lebendem Geflügel und der gezielten Ausmerzungen seropositiver Tiere erreicht.

5.3 Aviäres Metapneumovirus (Turkey rhinotracheitis, Swollen Head-Syndrom)

Die positiven Proben stammten aus 6 Freilandherden, sowie aus 4 Herden mit Bodenhaltung mit Aussenklimabereich - es handelte sich ausschliesslich um APV spezifische RNS des Subtyps A. Die PCR-Untersuchung zum Nachweis von APV spezifischer RNS des Subtyps B verliefen negativ. Es ist das erste Mal, dass aviäre Metapneumoviren des Subtyps A in der Schweiz nachgewiesen wurden. Dies entspricht nicht den Erwartungen, da in den letzten Jahren im europäischen Raum der Subtyp B prädominant geworden ist (Guionie et al., 2007). Auffallend

war zudem, dass alle betroffenen Herden aus BTS-Haltungssystemen stammten, also täglich in direktem Kontakt mit der Aussenwelt standen. Die Herden aus der herkömmlichen Bodenhaltung dagegen waren alle frei von aviären Metapneumoviren. Da das Virus meist horizontal über Aerosole übertragen wird, und bei verschiedenen Wildvogelarten Antikörper gegen AMPV gefunden wurden (Humphrey et al., 2002), besteht die Möglichkeit, dass die Viren via Wildvögel in die Legehennenherden gelangt sind. In den infizierten Legehennenherden scheinen die aviären Metapneumoviren bislang kein gesundheitliches Problem darzustellen, da von den Tierhaltern keine klinischen Auffälligkeiten berichtet wurden. Klinische Symptome bei einer Infektion mit aviären Metapneumoviren treten in der Regel erst bei einer bakteriellen Sekundärinfektion auf (Jirjis et al. 2002).

5.4 Infektiöses Bronchitis Virus (Infektiöse Bronchitis)

Bei der für diese Untersuchung verwendeten PCR wurde eine Gensequenz am 5'-Ende der "nichttranslatierten Region" amplifiziert. Dieser Genabschnitt ist konserviert und kommt deshalb bei allen Coronaviren des Huhnes vor (Callison et al., 2006a). Mit dieser Methode lässt sich eine infektiöse Bronchitis rasch von aviärer Influenza oder Newcastle Krankheit unterscheiden, die im Anfangsstadium der Infektion ähnliche klinische Symptome zeigen (Callison et al., 2006a). Dass gegen diese Erkrankung flächendeckend geimpft wird, widerspiegeln auch die Resultate dieser Studie (98 von 100 Herden positiv). Eine Unterscheidung zwischen Impf- und Feldviren ist mit der verwendeten PCR-Methode nicht möglich. Anhand der parallel durchgeführten serologischen Untersuchung konnte eine Eingrenzung vorgenommen werden. Dadurch konnte abgeschätzt werden, in welchen Herden eine Feldinfektion wahrscheinlich war. Vergleicht man diese Einteilung mit den Resultaten der PCR zeigen die Herden mit Feldinfektion 68% positive Proben, die Herden mit fraglicher Feldinfektion 58% positive Proben und die Herden mit fehlender Exposition 54% positive Proben. Somit konnten in Herden mit einer Feldinfektion kaum mehr positive Proben nachgewiesen werden als in Herden, welche ausschliesslich mit Impfstämmen Kontakt hatten. In Bezug auf die Haltungssysteme konnte kein deutlicher Unterschied hinsichtlich des Auftretens von Feldinfektionen festgestellt werden.

5.5 Gallines Herpesvirus 1 (Infektiöse Laryngotracheitis)

ILT ist in der Schweiz eine meldepflichtige Tierseuche. Infizierte Herden werden gekeult. Jährlich werden 5-20 Ausbrüche diagnostiziert, hauptsächlich in kleinen Rassegeflügelherden und selten beim Wirtschaftsgeflügel (Neff et al., 2008). Die Übertragung des Virus wird durch die zahlreichen Ausstellungen beim Rassegeflügel begünstigt. Inwieweit Rassegeflügelherden ein Reservoir für kommerzielle Geflügelherden bilden, ist nicht bekannt (Wunderwald et al., 2002).

In dieser Studie wurden neben den Staub auch Federn auf das Vorhandensein von ILTV spezifischer DNS getestet. In zwei von 100 Herden konnte DNS von ILTV in den Federproben nachgewiesen werden. Die beiden betroffenen Herden zeigten keine für ILT typische Klinik, es kann darum auf eine chronische oder latente Infektion geschlossen werden. Federproben als Untersuchungsmaterial wurden aufgrund von Untersuchungen in unserer Abteilung ausgewählt, die ergaben, dass das Virus der Infektiösen Laryngotracheitis nach einer Infektion im Federfollikelepithel zu finden ist (Rusch, persönliche Mitteilung, 2008). Auch das Pacheco Disease Virus (Psittacid Herpesvirus 1) kann in Federproben infizierter Psittaziden nachgewiesen werden (Ramis et al., 1996). Dieses Virus gehört ebenfalls zur Unterfamilie der Alphaherpesvirinae und ist nahe verwandt mit dem ILTV (Thureen et al., 2006).

5.6 Marek disease Virus (Mareksche Krankheit)

In der vorliegenden Untersuchung waren 14.9% der Proben positiv in der PCR auf das meq-Gen, welches spezifisch für MDV Serotyp 1 ist (Islam et al., 2006). Diese positiven Proben verteilten sich auf 72% der getesteten Herden. Da Impf- und Feldstämme im gleichen Betrieb coexistieren können (Islam et al., 2006) ist die Interpretation der PCR-Resultate schwierig. In der Schweiz wird in den meisten Betrieben gegen MD geimpft. In der Zeitspanne zwischen 1992 und 2003 war die Mareksche Krankheit die am häufigsten diagnostizierte virale Erkrankung im Sektionsgut der Abteilung für Geflügelkrankheiten der Vetsuisse Fakultät Zürich. Dass in dieser Periode die Häufigkeit von MD in Legehennenherden stark abnahm, ist auf eine intensive Schulung der Impftechnik und den Wechsel auf den Serotyp 1-Impfstoff zurückzuführen (Bart et al., 2003).

In dieser Studie wurden auch Federkiele getestet. Mehrere Studien haben die Eignung von Federmaterial zum Nachweis von MDV belegt (Davidson et al., 2002; Baigent et al., 2005b). Dieselbe Methode wird bereits erfolgreich zur Impfüberwachung eingesetzt (Baigent et al. 2006b). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Menge an nachgewiesener Virus-DNS kurz nach der Impfung mit dem Grad des Impfschutzes korreliert.

Viruspartikel werden zusammen mit dem Federfollikelepithel abgestossen und bleiben in trockenem Staub bis zu einem Jahr infektiös (Davidson et al., 2002). Dass virale DNS in Staubproben gefunden wird (Renz et al., 2006), zeigen auch die Resultate der vorliegenden Untersuchung. Bei den verschiedenen Probenmaterialien hatten die Staubproben den höchsten Anteil an positiven Resultaten (44.5%) gefolgt von den Federproben (37%).

5.7 Mycoplasma gallisepticum (Mykoplasmose)

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der PCR das MG0319-Gen nachgewiesen, welches spezifisch für *Mycoplasma gallisepticum* ist (Callison et al., 2006b). Die 10 positiven Proben (1.7%) verteilten sich auf drei Herden. Da keine der drei Herden gegen *M. gallisepticum* geimpft wurde, ist davon auszugehen, dass alle drei Herden mit *Mycoplasma gallisepticum*-Feldstämmen infiziert wurden.

Mykoplasmen lassen sich, wie von Callison und Mitarbeitern (2006b) beschrieben, vor allem in Tupferproben der Choane oder der Trachea nachweisen. Die Resultate der vorliegenden Studie bestätigen dies. Bei den infizierten Herden waren bis zu 100% der Choanentupfer positiv. Interessant ist auch, dass in diesen Herden Mykoplasmen oft auch in Staubproben zu finden waren.

5.8 Staub - und Federproben

Staub und Federn sind als Probenmaterial einfach zu gewinnen. Staub ist in allen Stallungen vorhanden, und Federn können ohne grossen Aufwand direkt am Tier gewonnen werden. Die Staubproben wurden in dieser Studie mit einem Handstaubsauger gewonnen. Austauschbare,

sterile Baumwollsäckchen wurden für die Extraktion des Genmaterials verwendet (Renz et al., 2006). Die 10 kurzen Halbdunenfedern konnten während der Blutgewinnung gezupft werden, womit die Hühner nicht einem zusätzlichen Stress ausgesetzt waren.

Die Staubproben wurden in dieser Studie mittels PCR auf alle beschriebenen Erreger untersucht - dies im Gegensatz zu den Federproben, welche nur für den Nachweis von Herpesviren verwendet wurden. Eine Arbeit aus Japan (Yamamoto et al., 2008) hat jedoch gezeigt, dass auch AI Viren (H5N1) während einer Infektion in den Federfollikeln nachgewiesen werden können.

Die Staubproben erwiesen sich als geeignetes Probenmaterial für den Nachweis von Herpesviren - insbesondere für den Nachweis von MDV spezifischer DNS konnte die gute Aussagekraft gezeigt werden, die bereits in mehreren Arbeiten beschrieben wurde (Islam et al., 2006; Renz et al., 2006; Davidson et al., 2002). Bei der Untersuchung auf ILTV waren alle Staubproben negativ, obwohl ILTV spezifische DNS in den Federproben von 2 Herden nachgewiesen werden konnte. Eine Erklärung kann darin liegen, dass bei latenten Infektionen mit ILTV keine Replikation stattfindet und somit auch keine Viruspartikel in die Umgebung abgegeben werden. Bei einer akuten Infektion mit ILTV sind Viruspartikel im Staub nachzuweisen (Rusch, persönliche Mitteilung, 2008). IBV spezifische RNS war in Staubproben häufiger zu detektieren als in allen übrigen Probenmaterialien. Schliesslich wurden auch bei der Untersuchung auf Mg in zwei der drei betroffenen Herden positive Staubproben gefunden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Staubproben für viele Erreger ein geeignetes und einfach zu gewinnendes Probenmaterial sind. So sind AIV und NDV bei einer Temperatur von 20°C im Staub lange nachweisbar (Lu et al., 2002). Die Auswertung der Staubproben dieser Studie zeigte, dass Staubproben aus dem Vorraum häufiger positiv (69%) waren als Staubproben aus den Legenestern (59%). Meistens weist der Vorraum - oft nur durch ein Gitter vom Geflügelstall getrennt - grosse Mengen an Staub auf, wie sie in Legenestern selten gefunden werden. Dies scheint für den Erregernachweis mittels PCR von Vorteil zu sein.

Die in der vorliegenden Studie untersuchten Federproben sind ein sensitives Probenmaterial für den Nachweis von Herpesviren. Untersuchungen haben gezeigt, dass ab dem 7. Tag p.i. MDV im Federfollikelepithel (FFE) nachzuweisen sind (Abdul-Careem et al., 2006). Der grosse Vorteil von Federproben gegenüber den Staubproben liegt darin, dass sie Informationen über das Einzeltier liefern (Baigent et al., 2006b), und dass auch latente Infektionen nachgewiesen werden können.

6. Zusammenfassung

Während eines Jahres wurden 100 Schweizer Legehennenherden kurz vor der Ausstellung beprobt und mittels real-time PCR auf ausgewählte Krankheitserreger des Nutzgeflügels untersucht. Die Herden stammten aus drei unterschiedlichen Haltungssystemen (ausschliessliche Stallhaltung, Stall mit Aussenklimabereich, Stall mit Freilandhaltung) und getestet wurden Kloaken- und Choanentupfer, sowie Staub- und Federproben. Folgende Infektionserreger wurden geprüft: Aviäre Influenza Virus, Newcastle Krankheit Virus, Infektiöse Bronchitis Virus, aviäre Pneumoviren, Marek Virus und Infektiöse Laryngotracheitis Virus sowie *Mycoplasma gallisepticum*.

In allen 1398 Proben wurde keine spezifische RNS des Aviären Influenza Virus und des Newcastle Krankheit Virus gefunden. Diese Resultate bestätigen den Status der Seuchenfreiheit in der Schweiz. 10% der Herden wurden auf das Aviäre Pneumovirus des Subtyps A positiv getestet. Es ist das erste Mal, dass der Subtyp A in der Schweiz nachgewiesen wurde. In der PCR zum Nachweis von Infektiöse Laryngotracheitis Virus zeigten Federproben aus zwei Herden positive Resultate, während alle anderen Probenmaterialien negativ waren. In drei Herden konnten vor allem anhand von Choanentupferproben Infektionen mit *Mycoplasma gallisepticum* nachgewiesen werden. Die positiven Resultate beim Nachweis des Infektiösen Bronchitis Virus und des Virus der Marekschen Krankheit waren aufgrund des gleichzeitigen Auftretens von Impf- und Feldstämmen schwierig zu interpretieren.

Staubproben eignen sich gut für PCR- Untersuchungen zum Nachweis von Herpesviren, IBV und *Mycoplasma gallisepticum*. Federn sind ein einfach zu gewinnendes, aussagekräftiges Probenmaterial für den Nachweis von latenten Herpesviren.

Summary

100 Swiss laying flocks have been tested for selected avian pathogens using real-time PCR shortly before slaughter. The flocks were from three different housing systems, in house (10), controlled outdoor area (48) and free range (42). The material consisted of cloacal and choanal swabs, dust and feathers and was tested for Avian Influenza, Newcastle disease, infectious Bronchitis, avian Pneumovirus, Marek disease, infectious Laryngotracheitis and *Mycoplasma gallisepticum*.

All 1398 samples were free from Avian Influenza and Newcastle disease virus. Ten flocks were positive for Avian Pneumovirus subtype A. This is the first report that avian Pneumovirus subtype A is present in Swiss laying flocks. Feathers of two flocks showed a positive result for infectious Laryngotracheitis virus (ILTV), while all other samples were negative. In three flocks *Mycoplasma gallisepticum* could be detected primarily in the choanal swabs. The high number of positive samples for Infectious Bronchitis and Marek disease is difficult to interpret due to the lack of differentiation between vaccine and field strains. Dust samples can be used for the detection of Herpes viruses, IBV and *Mycoplasma gallisepticum*, whereas feathers are suitable for the diagnosis of latent Herpes virus infection.

In conclusion, the housing system seems to have no significant influence on the prevalence of avian pathogens in Swiss laying flocks.

7. Literaturverzeichnis

- Alexander D.J. "A review of avian influenza in different bird species" *Veterinary Microbiology* (2000) 74: 3-13
- Ashrud M.D., K. Tune, S. Munir, B. Panigrahy, S.M. Goyal, V. Kapur "PCR-based detection of an emerging avian pneumovirus in US turkey flocks" *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (2001) 13: 201-205
- Abdul-Careem M.F., B.D. Hunter, E. Nagy, L.R. Read, B. Sanei, J.L. Spencer, S. Sharif "Development of a real-time PCR assay using SYBR Green chemistry for monitoring Marek's disease virus genome load in feather tips" *Virological Methods* (2006) 133: 34- 40
- Baigent S.J., L.P. Smith, R.J.W. Currie, V.K. Nair "Replication kinetics of Marek's disease vaccine virus in feathers and lymphoid tissues using PCR and virus isolation" *Journal of General Virology* (2005a) 86: 2989-2998
- Baigent S.J., L.J. Petherbridge, K. Howes, L.P. Smith, R.J.W. Currie, V.K. Nair "Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR" *Journal of Virological Methods* (2005b) 123: 53-64
- Baigent S.J., V.K. Nair, R.J.W. Currie "Real-time quantitative PCR for Marek's disease vaccine virus in feather samples: applications and opportunities" *Developmental Biology* (2006a) 126: 271-281
- Baigent S.J., L.P. Smith, V.K. Nair, R.J.W. Currie "Vaccinal control of Marek's disease: Current challenges, and future strategies to maximize protection" *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2006b) 112: 78-86
- Bart M., R. Hoop "Diseases in Swiss layer flocks – a 12 year overview after ban of cages" *Veterinary Record*, in press
- Baumer A.M., "Aviäre Influenza: molekularbiologische Untersuchung von Wildvögeln und Seroscreening von Wirtschaftsgeflügel in der Schweiz" *Inaugural-Dissertation, Vetsuisse-Fakultät Zürich* (2005)
- Bayon-Auboyer M.H., C. Arnould, D. Toquin, N. Eterradossi "Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup" *Journal of General Virology* (2000) 81: 2723-33
- Callison S.A., D.A. Hilt, T.O. Boynton, B.F. Sample, R. Robison, D.E. Swayne, M.W. Jackwood "Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of

- infectious bronchitis virus from infected chickens." *Journal of Virological Methods* (2006a) 138: 60-65
- Callison S.A., S.M. Ribble, S. Sun, N. Ikuta, D. Hilt, V. Leiting, S.H. Kleven, D.L. Suarez, M. Garcia "Development and validation of a real-time Taqman polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* in naturally infected birds." *Avian Diseases* (2006b) 50: 537–544
- Callison S.A., S.M. Riblet, I. Oldoni, S. Sun, G. Zavala, S. Williams, R.S. Resurreccion, E. Spackman, M. García " Developement and validation of a real-time Taqman PCR assay for the detection and quantitation of infectious laryngotracheitis virus in poultry " *Journal of Virological Methods* (2007) 139: 31-34
- Calnek B.W., H.K. Adldinge, D.E. Kahn "Feather follicle epithelium: a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease" *Avian Diseases* (1970) 14: 219-233
- Cavanagh D., "Coronavirus avian infectious bronchitis virus" *Veterinary Research* (2007) 38: 281-297
- Camenisch C., R.K. Hoop "Monitoring of wild birds for Newcastle disease virus in Switzerland using real time RT-PCR" *Journal of Wildlife Diseases*, accepted
- Dalessi S., R. Hoop, M. Engels "The 2005/2006 Avian Influenza Monitoring of Wild Birds and Commercial Poultry in Switzerland." *Avian Diseases* (2006) 51: 355-358
- Davidson I., R. Borenshtain "The feather tips of commercial chickens are a favorable source of DNA for the amplification of Marek's disease virus and avian leucosis virus, subgroup J" *Avian Pathology* (2002) 31: 237-240
- Gohm D.S., B. Thür, L. Audigé, M.A. Hofmann "A survey of Newcastle disease in Swiss laying-hen flocks using serological testing and simulation modelling." *Preventive Veterinary Medicine* (1999a) 38: 277-288
- Gohm D., E. Schelling, L. Audigé, B. Thür " Newcastle-Krankheit – seroepidemiologische Untersuchung einer hochansteckenden Tierseuche beim Geflügel und bei Wildvögeln in der Schweiz " *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* (1999b) 12: 549-588
- Gough, R.E., M.S. Collins, W.J. Cox, N.J. Chettle " Experimental infection of turkeys, chickens, ducks, geese, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus." *Veterinary Record* (1988) 123: 58–59
- Guan J., M. Chan, B. Ma, C. Greiner, D.C. Wilkie, J.Pasick, B.W. Brooks, J.L. Spencer "Development of Methods for Detection and Quantification of Avian Influenza and

- Newcastle Disease Viruses in Compost by Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction and Virus Isolation" *Poultry Science* (2008) 87: 838-843
- Guionie O., D.Toquin, E. Sellal, S. Bouley, F. Zwingelstein, C. Allée, S. Bougeard, S. Lemièrre, N. Etteradossi "Laboratory evaluation of quantitative real-time reverse transcription PCR assay for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumovirus." *Journal of Virological Methods* (2007) 139: 150-158
- Handberg K.J., O.L. Nielson, P.H. Jørgensen "The use of serotype 1- and serotype 3-specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens" *Avian Pathology* (2001) 30: 243-249
- Hoop R.K. "Tiergesundheit in der schweizerischen Geflügelwirtschaft – Rückblick, aktuelle Schwierigkeiten und Ausblick" *Archiv für Geflügelkunde* (2002) 66: 114-118
- Hoop R.K., C. Wunderwald "A five year retrospective serological survey of Swiss replacement and laying flocks" *Avian Diseases*, submitted
- Isalm A., B.F. Cheetham, J.M. Timothy, P.L. Young, S.W. Walkden-Brown "Absolute quantitation of Marek's disease virus and Herpesvirus of turkeys in chicken lymphocyte, feather tip and dust samples using real-time PCR" *Journal of Virologic Methods*, (2006) 132: 127-134
- Jirjis F.F., S.L. Noll, D.A. Halvorson, K.V. Nagaraja, D.P. Shaw "Pathogenesis of Avian Pneumovirus Infection in Turkeys." *Veterinary Pathology* (2002) 39: 300-310
- Keeler C.L., L.L. Hnatow, P.L. Whetzel, J.E. Dohms "Cloning and characterization of a putative cytoadhesin gene (mgc1) from *Mycoplasma gallisepticum*." *Infection and Immunity* (1996) 1541-1547
- Lu H., A. E. Castro, K. Pennick, J. Liu, Q. Yang, P. Dunn, D. Weinstock, D. Hemzler "Survival of Avian Influenza Virus H7N2 in SPF Chickens and Their Environments" *Avian Diseases* (2002) 47: 1015-1021
- Lwamba H.C., R.S. Bennett, D.C. Lauer, D.A. Halvorson, M.K. Njenga "Characterization of avian metapneumoviruses isolated in the USA " *Animal Health Research Reviews* (2002) 3(2): 107-117
- Mardani K., G.F. Browning, J. Ignjatovic, A.H. Noormohammadi "Rapid differentiation of current infectious bronchitis virus vaccine strains and field isolates in Australia." *Australian Veterinary Journal* (2006) 84: 59-62
- Neff C., C. Sudler and R.K. Hoop "Characterization of western european field isolates and vaccine strains of avian Infectious Laryngotracheitis virus by Restriction Fragment Length Polymorphism and sequence analysis" *Avian Diseases* (2008) 52: 278-283

- Pham H.M., S. Konnai, T. Usui, K.S. Chang, S. Murata, M. Mase, K. Ohashi, M. Onuma "Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus by real-time PCR with melting-curve analysis." *Archives of Virology* (2005) 150(12): 2429-38
- Ramis A., J. Tarrés, D. Fondevila, L. Ferrer, "Immunocytochemical study of the pathogenesis of Pacheco's parrot disease in budgerigars" *Veterinary Microbiology* (1996) 52: 49-61
- Renz G.R., A. Islam, B.F. Cheetham, S.W. Walkden-Brown, "Absolut quantification using real-time polymerase chain reaction of Marek's disease virus serotype 2 in field dust samples, feather tips and spleens" *Journal of Virological Methods* (2006) 135: 186-191
- Rutz C., S. Dalessi, A. Baumer, M. Kestenholz, M.Engels, R. Hoop " Aviäre Influenza - Wildvogelmonitoring in der Schweiz zwischen 2003-2006" *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* (2007) 149: 501-509
- Rusch M., persönliche Mitteilung, 2008
- Sellers H.S., M. García, J.R. Glisson, T.P. Brown, J.S. Sander, J.S. Guy "Mild Infectious Laryngotracheitis in Broilers in the Southeast " *Avian Diseases* (2003) 48: 430-436
- Thureen D.R., C.L. Keeler "Psittacid Herpesvirus 1 and Infectious Laryngotracheitis Virus: Comparative Genome Sequence Analysis of Two Avian Alphaherpesviruses" *Journal of Virology* (2006) 80: 7863-7872
- Werner O., "Klassische Geflügelpest- Eine Übersicht" *Berliner Münchner Tierärztliche Wochenschrift* (2006) 119: 140-150
- Wise M.G., D.L. Suarez, B.S. Seal, J.C. Pederson, D.A. Senne, D.J. King, D.R. Kapczynski, E. Spackman "Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for Detection of Newcastle Disease Virus RNA in Clinical Samples" *Journal of Clinical Microbiology* (2004) 42: 329-338
- Wunderwald C., R.K. Hoop "Serological monitoring of 40 Swiss fancy breed poultry flocks" *Avian Pathology* (2002) 31: 157-162
- Yamamoto Y., K. Nakamura, M. Okamatsu, M. Yamada, M. Mase "Avian Influenza Virus (H5N1) Replication in Feathers of Domestic Waterfowl" *Emerging Infectious Diseases* (2008) 14: 149-151

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die in irgendeiner Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Richard Hoop, für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die gute Unterstützung und für die schnelle Korrekturarbeit,

Prof. Dr. Jean-Michel Hatt, für die Übernahme des Korreferats,

dem **Bundesamt für Veterinärwesen resp. der EU** für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des EU-Safehouseprojektes

Margrit Kreienbühl, Brigitte Sigrist, Roswitha Keller und Regula Güttinger für die Tips und Tricks beim Arbeiten im Labor und für die grosse Hilfe und Unterstützung beim Verarbeiten der Proben,

Myriam Harisberger für die Beprobung der 100 Herden und für die sehr gute Zusammenarbeit,

Dr. Corinne Nievergelt-Rutz, Dr. Martina Rusch und Dr. Andrea Vögtlin für die herzliche Unterstützung,

Dr. Sabina Leisinger für die Hilfe bei der Probenerhebung, für die Hilfe bei der Laborarbeit und für die Unterstützung im logistischen Bereich,

meinen **Eltern**, für die grosse Unterstützung und Aufmunterung während dieser Zeit,

der Firma Intervet aus den Niederlanden für den Virusstamm Nobilis® Rhino AMPV subtype B,

und zuletzt ein Dankeschön an meine Freundin, meine Brüder, meine Mitbewohner und allen meinen Freunden für ihre tatkräftige Unterstützung.

Curriculum Vitae

Personalien

Name:	Risch Bandli
Geburtsdatum:	03.11.1979
Geburtsort:	Chur
Nationalität:	Schweizer
Heimatort:	Andeer

Ausbildung

2006-08	Doktorand am Institut für Veterinärbakteriologie der Vetsuisse Fakultät Zürich, Schweiz
2005	Staatsexamen an der Vetsuisse Fakultät Zürich, Schweiz
2000-05	Studium der Veterinärmedizin an der Vetsuisse Fakultät Zürich, Schweiz
1994-99	Evangelische Mittelschule Schiers mit Maturaabschluss Typus D
1992-94	Sekundarschule Zillis
1986-92	Primarschule Donat